

拟南芥冷害胁迫下基因表达谱的统合分析

徐兆华¹, 吴为人^{1,2}

(1 浙江大学 农业与生物技术学院, 浙江 杭州 310058; 2 福建农林大学 作物科学学院, 福建 福州 350002)

摘要:对4套不同来源的拟南芥冷胁迫芯片试验数据进行了统合分析,并与各试验单独分析的结果进行了比较. 结果表明,那些在2个或2个以上试验中被同时检测到的“较可靠的”差异表达基因(Differentially expressed gene, DEG)大多数都能被统合分析检测出来,而那些只在1个试验中被检测到的“较不可靠的”DEG则大约只有1/4被统合分析检测到,说明统合分析适合于检测“较可靠的”DEG. 在统合分析检测到的DEG中,约有9%是未被单独分析检测到的,其中包含6个与冷害胁迫直接相关的基因,说明统合分析还可以检测到被单独分析忽略的DEG. 基因本体和启动子基序分析显示,统合分析检测到的DEG确实与冷胁迫有着密切的关系.

关键词:冷胁迫; 微阵列; 差异表达基因; 统合分析
中图分类号:S511; S502 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2013)04-0511-06

Meta-analysis of Gene Expression Profile Under Cold Stress of *Arabidopsis*

XU Zhaohua¹, WU Weiren^{1,2}

(1 College of Agriculture & Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;
2 College of Crop Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Meta-analysis of microarray data from four published cold stress experiments in *Arabidopsis thaliana* were performed to detect differentially expressed genes (DEGs). The results were compared with those obtained by the separate analyses of the individual experiments. The results showed that most of those “more reliable” genes, which were detected in two or more experiments, were detectable in the meta-analysis, whereas merely a quarter of those “less reliable” genes, which were detected only in a single experiment, were detectable in the meta-analysis. This suggested that meta-analysis was suitable for detecting “more reliable” DEGs. It was noticeable that 9% of the genes detected by the meta-analysis, among which 6 genes were directly related to the response to cold stress, were not detected by the separate analyses, indicating that meta-analysis could detect some DEGs neglected by separate analyses. Gene ontology (GO) and promoter motif analyses suggested that the DEGs detected by the meta-analysis were indeed closely related to cold response.

Key words: cold stress; microarray; differentially expressed gene (DEG); meta-analysis

基因芯片能够在基因组水平上分析基因表达谱. 检测不同条件下的差异表达基因(Differentially expressed gene, DEG)是基因芯片技术的一个主要应用方向^[1-2]. 近年来,随着基因芯片等表达谱分析技术的出现,大量的冷调控基因被发现^[4-5]. 但是通过比较发现,不同试验得到的DEG数量从几百到数千

不等,结果差异很大^[6-9].造成这种低重现率的重要原因之一就是试验中所用的样本(重复芯片)数量不足,从而降低了统计功效^[10].

统合分析(Meta-analysis)是一种经典的统计分析方法.该方法的特点是将关于同一科学问题的不同研究当中可以合并的信息整合起来进行分析,以此取得更加可靠的结果^[11].近年来,统合分析被应用于芯片试验数据的整合分析^[12-14].与单个试验相比,将多个实验室来源的数据合并起来可以大大增加统计分析的样本量,使得分析结果更加可靠有效.

迄今为止,有关基因芯片数据的统合分析多集中在方法研究,实际应用的研究还很少.本文利用SAM软件对来自4个不同实验室的拟南芥冷胁迫处理芯片数据进行了统合分析,对基于SAM的统合分析的可行性和有效性及其实际应用进行了探索.研究表明,统合分析能够比单独分析检测出更多可靠的DEG,并能检测出一批单独分析没有检测到的DEG,为统合分析的实际应用提供一个范例.

1 材料与方法

1.1 数据来源

本研究中所用的数据是从数据库GEO和NASCArrays下载得到,试验编号分别为GSE5535、GSE5620、GSE5621、GSE6177和NASCARRAY-404.其中,GSE5620是GSE5621的对照试验,两者组成1套试验数据.这样,本研究所用数据总共包括4套与拟南芥冷胁迫处理有关的芯片试验数据.这4个试验中,总RNA均来自植株的地上部分.所用芯片都是Affymetrix第1代拟南芥基因组芯片,其中包含22746个拟南芥基因.每个试验中都有1个共同的处理,即4℃条件下处理24h.将4个试验中由这一共同处理得到的试验数据分别命名为D1、D2、D3和D4.其中,D1来自GSE5535,D2来自GSE5620和GSE5621,D3来自GSE6177,D4来自NASCARRAY-404.D1、D2和D3各包含4张芯片数据,对照和处理各2张;D4则包含6张芯片数据,对照和处理各3张.每个基因表达强度值都由一组探针合并计算而来,每个值都有一个标示(Call)值来表示其检测质量,分别为出现(Present)、临界(Marginal)和缺失(Absent).

1.2 数据预处理

首先对试验数据进行预处理和筛选.用于单独分析的数据先做以2为底的对数转换,然后进行筛

选.筛选的原则是如果某个基因在1个试验75%以上的芯片(即在D1、D2和D3中的3张或3张以上芯片,D4中的5张或5张以上芯片)中的表达数据Call值为Present或Marginal,则该基因的数据保留下来做后续的分析.

将来自4套试验共18张芯片的数据合并起来组成一个大的数据集用于统合分析,命名为Dm.用DNA-chip analyzer(dChip)软件^[15]对合并的数据进行重新的标准化处理.标准化后的数据做以2为底的对数转化,再用与单独试验同样的筛选原则进行筛选.经过以上筛选后,Call值为Absent的数据被剔除,作为缺失数据处理.

1.3 差异表达基因的检测

SAM(Significance analysis of microarrays)是目前最流行的统计分析软件之一,主要用于DEG的检测^[16].该方法采用经验分布来估计误差而不需要对误差分布进行假设,能够克服不同来源数据之间的异质性问题.本研究采用SAM软件进行DEG的检测.参数选择如下:分析模式选用“Two class unpaired”;显著性水平FDR阈值设为0.01;缺失数据由SAM自带的软件处理;其他参数采取默认设置.

1.4 基因本体(Gene ontology,GO)的分析

采用基于网络服务器的EasyGO软件^[17]对统合分析检测到的DEG进行GO富集分析,上调基因(Up-regulated gene,URG)和下调基因(Down-regulated gene,DRG)分开来分析.软件的参数选择如下:模型选用卡方检验;显著性水平用假阳性率(False discovery rate,FDR)来表示,阈值设为0.01;其他参数采取默认设置.

1.5 启动子基序的分析

利用一个基于网络的分析工具Athena^[18]中的一个模块Analysis suite来分析DEG启动子中的顺式作用元件.

2 结果与分析

2.1 差异表达基因的检测

经过数据的预处理和筛选,D1、D2、D3、D4和Dm分别保留了13214、13243、13499、13218和12791个基因用以检测DEG(表1).通过比较发现,D1、D2、D3和D4中保留的基因不但在数量上接近,而且两两之间重叠的基因都不低于92%.说明4套不同来源的试验彼此之间在基因表达上还是比较稳定的.

本研究从4个单独试验中总共检测到10 684个DEG,其中包括3 816个URG和6 868个DRG.然而,单独试验之间DEG的数量却差异很大.DEG的总数介于707~7719,其中URG的数量在483~2 678,DRG的数量在224~5 491(表1).

表1 单独和统合分析检测的DEG
Tab.1 Numbers of DEGs detected in the individual and the mixed datasets

数据	芯片数 ¹⁾	基因数目	DEG数目		
			URG	DRG	总数
D1	4(2C+2T)	13 214	483	224	707
D2	4(2C+2T)	13 243	2 228	5 491	7 719
D3	4(2C+2T)	13 499	2 678	3 715	6 393
D4	6(3C+3T)	13 218	1 152	2 132	3 284
Dm	18(9C+9T)	12 791	3 134	2 983	6 117

1)C表示对照,T表示处理.
能够被多个试验共同检测到的DEG随着试验数量的增加迅速减少(表2).结果表明,不同试验得到的DEG,无论是数量上还是基因本身都存在非常显著的

差异.可以将4个单独试验中检测到的所有DEG分为2组:一组称为“较可靠”(More reliable)的DEG(简称mrDEG),它们至少被2个或2个以上单独试验检测到;另一组称为“较不可靠”(Less reliable)的DEG(简称lrDEG),它们只被1个单独试验检测到.

统合分析从Dm中分别检测到3 134个URG和2 983个DRG(表1).尽管统合分析检测到的URG和DRG比单独试验的总和要少,但URG的数量是mrDEG中URG的两倍,DRG的数量也几乎与mrDEG中相当(表2).统和分析检测到了25.8%的lrDEG,在URG当中尤其明显,比例达到48.9%(表2).在统合分析检测到的DEG中,有553个基因没有被任何单独试验检测到,其中包括521个URG和32个DRG,占其总数的9.0%.以上结果表明,统合分析不但能够非常高效地识别mrDEG,而且还能够有效地鉴别不少lrDEG,甚至能够发现一些不能被单独试验检测到的DEG.为了证实统合分析检测出的DEG的可靠性,本研究对统合分析识别的DEG进行了基因本体(GO)和启动子基序分析.

表2 多个试验检测的DEGs
Tab.2 Numbers of DEGs simultaneously detected in different analyses

试验数目	单独分析检测的DEG数目			单独分析与统合分析的DEG重叠数目/% ¹⁾		
	URG	DRG	总数	URG	DRG	总数
1	2 192	3 695	5 887	1 071(48.9)	448(12.1)	1519(25.8)
2	1 624	3 173	4 797	1 542(95.0)	2 503(78.9)	4 045(84.3)
3	784	1 389	2 173	783(99.9)	1 369(98.6)	2 152(99.0)
4	317	132	449	317(100)	132(100)	449(100)
总数	3 816	6 868	10 684	2 613(68.5)	2 951(43.0)	5 564(52.1)

1)括号中数值是指统合分析DEG占单独分析DEG的重叠比例.

2.2 GO分析

GO包括3方面的内容:生物学过程(Biological process,BP)、分子功能(Molecular function,MF)和细胞组分(Cellular component,CC)^[19].由于BP能够比较直观地评价DEG的合理性,所以本文的分析就集中在BP上,特别是与各种应激反应有关的GO条目(Term).将统合分析检测的URG和DRG分别进行GO分析,结果见表3.
从表3可以看出,URG在BP中的富集条目,有1个直接与冷胁迫有关,共包含69个基因.由于本研究所选的4个试验都是研究拟南芥在冷胁迫条件下的基因表达谱,因此这个结果是符合预期的.另外,有研究^[20]表明,不同的信号反应途径之间可能存在着一些共有的集合,使得植物不同的胁迫反应之间存在着一定的交叉现象.

通常情况下,大多数植物都生长在昼夜交替的光照和温度条件下.有研究表明,一些受昼夜节律调控的基因也是与冷胁迫反应有关的^[21].在富集的条目中,除了与应激或胁迫有关外,还有与昼夜节律和繁殖等有关的条目在URG中得到富集.
分析表明由统合分析检测出的553个DEG中确实富集了许多与各种外界胁迫反应有关的基因,包括6个直接与冷胁迫反应相关的基因:AT4G01370^[22-23]、AT1G31812^[24]、AT5G12250^[25]、AT3G49910^[26]、AT1G17190^[27-29]、AT4G36930^[30-31],这几个基因在单独试验的结果中都没有被检测到,可见统合分析弥补了单独分析的不足.
2.3 启动子基序分析
对统合分析检测的DEG的启动子区域进行了基序的分析(表4).总共有16个基序在这些DEG的

表 3 统合分析检测的 DEG 的 GO 富集分析¹⁾

Tab.3 Gene ontology enrichment in the DEGs identified by meta-analysis

基因类型	GO 分类	基因数目	基因类型	GO 分类	基因数目
URG	GO: 0008150 biological process	3 134	URG	GO: 0007623 circadian rhythm	15
	GO: 0050896 response to stimulus	449		GO: 0032501 multicellular organismal process	225
	GO: 0009628 response to abiotic stimulus	213		GO: 0000003 reproduction	10
	GO: 0009266 response to temperature stimulus	93		GO: 0009987 cellular process	1 284
	GO: 0009409 response to cold	69		GO: 0051179 localization	105
	GO: 0009415 response to water	49		GO: 0022414 reproductive process	124
	GO: 0009414 response to water deprivation	47		GO: 0008152 metabolic process	1 108
	GO: 0006970 response to osmotic stress	89		GO: 0032502 developmental process	426
	GO: 0006972 hyperosmotic response	15	DRG	GO:0008150 biological process	2 983
	GO: 0009651 response to salt stress	83		GO:0050896 response to stimulus	419
	GO: 0009719 response to endogenous stimulus	119		GO:0009628 response to abiotic stimulus	168
	GO: 0009725 response to hormone stimulus	112		GO:0009314 response to radiation	75
	GO: 0009737 response to abscisic acid stimulus	70		GO:0009416 response to light stimulus	74
	GO: 0042221 response to chemical stimulus	261		GO:0009605 response to external stimulus	52
	GO: 0010035 response to inorganic substance	102		GO:0009987 cellular process	1 166
	GO: 0010038 response to metal ion	98		GO:0051179 localization	64
	GO: 0006950 response to stress	266		GO:0008152 metabolic process	1 123
	GO: 0048511 rhythmic process	15			

1) $P\leqslant 0.01$.

表 4 统合分析检测的 DEG 的启动子基序富集分析¹⁾

Tab.4 Promoter motif enrichment in DEGs detected by meta-analysis

富集的基序	基因数目		数据库	特征序列
	URG	DRG		
ABFs binding site motif	147		AtcisDB	CACGTGGC
ABRE binding site motif	204		AtcisDB	YACGTGGC
ABRE-like binding site motif	749	632	AtcisDB	BACGTGKM
ACGTABREMOTIFA2OSEM	563	480	PLACE	ACGTGKC
CACGTGMOTIF	562	469	PLACE	CACGTG
DRE core motif	888		Literature	RCCGAC
DREB1A/CBF3 motif	342		Literature	RCCGACNT
EveningElement promoter motif	336		AtcisDB	AAAATATCT
GADOWNAT	336		PLACE	ACGTGTC
GBF1/2/3 BS in ADH1	72		AtcisDB	CCACGTGG
GBOXLERBCS	120		PLACE	MCACGTGGC
Ibox promoter motif		1158	AtcicDB	GATAAG
LTRE promoter motif	211		AtcisDB	ACCGACA
TELO-box promoter motif	356		AtcisDB	AAACCCTAA
TGA1 binding site motif		122	AtcisDB	TGACGTGG
UPRMOTIFIAT		122	PLACE	CCACGTCA

1) $P\leqslant 10^{-4}$.

启动子区域得到富集. 其中,URG 的启动子区域有 13 个基序出现富集,DRG 的启动子区域有 6 个基序出现富集. 其中,有 3 个基序在 URG 和 DRG 的启动子区域都出现富集.

这 16 个基序基本可以分成 3 组. 第 1 组包括 3 个基序,即“DRE core motif”、“DREB1A/CBF3 motif”和“LTRE promoter motif”. 这 3 个基序的序列中都含有 1 个共同的核心序列,即“CCGAC”. 有研究表明,

这个核心序列存在于大量的受冷胁迫调控的植物基因的启动子区域^[32]。

第2组由“ABFs binding site motif”、“ABRE binding site motif”、“ABRE-like binding site motif”、“ACGTABREMOTIFA2OSEM”和“GADOWNAT”5个基序组成。它们都是与植物的脱落酸(Absciscic acid, ABA)反应有关的基序。ABA在植物应对干旱与高盐胁迫以及种子的成熟与休眠当中扮演着重要的角色^[33]。内源ABA的含量在植物遭遇冷胁迫时会持续增加,而且外源ABA的应用还会提高植物对冷害的忍耐能力^[34]。这些都说明ABA在植物应对冷害威胁的过程中起着关键的作用。

第3组是包含基序最多的一个组,共有“CACGTGMOTIF”、“EveningElement promoter motif”、“GBF1/2/3 BS in ADH1”、“GBOXLERBCS”、“lbox promoter motif”、“TELO-box promoter motif”、“TGA1 binding site motif”和“UPRMOTIFIAT”8个基序。这些基序都受到光的调控。已知在包括拟南芥在内的许多植物中,光照能提高其对冷胁迫的忍耐能力^[35-36]。植物光敏色素B是光信号传导途径中的一个光受体,它通过一个顺式作用元件“CRT/DRE”来激活低温诱导下的基因表达谱^[37]。这说明,在光反应和冷胁迫反应之间也存在着一定的交叉。以上3组启动子基序都是与植物应对冷胁迫有关的。再一次证明,统合分析识别的DEG是与冷胁迫有关的,其结果是可靠的。

3 讨论与结论

在利用基因芯片进行各种研究时,各个试验之间DEG的重现率往往较低。这是一个始终困扰着学者们的难题,它表明许多从芯片试验中检测到的DEG可靠性都存在着一定程度的问题^[38]。统合分析通过整合来自多个试验的有用信息来增加试验结果的可靠性,为提高DEG的检测效率提供了一条可行之路。本研究的结果表明,统合分析的应用显著地提高了DEG检测的可靠性。

此外,统合分析还检测到了553个未被单独分析检测到的DEG。通常认为,一个基因在统合分析结果中是否表现出差异显著取决于它在各个试验之间的表达变化的大小(平均效应)和其表达行为的一致性^[12]。平均效应越高,表达越一致,其在统计分析中的表现越显著,越有可能被统合分析检测出来^[13]。因此,上述的553个DEG,尽管其对冷胁迫的反应不是很强烈,但它们在4个单独试验中的差异表达是一致的,所以能被统合分析检测出来,弥补了单独分析

的不足。这是统合分析的另一个优点。

参考文献:

- [1] SCHENA M, SHALON D, DAVIS R W, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with complementary DNA microarray[J]. Science, 1995, 270(5235): 467-470.
- [2] CHU Tzuming, DENG Shibing, WOLFINGER R, et al. Cross-site comparison of gene expression data reveals high similarity[J]. Environ Health Perspect, 2004, 112(4): 449-455.
- [3] LEVITT J. Responses of plants to environmental stress[M]. 2nd Ed, New York: Academic Press, 1980: 137-141.
- [4] CHINNUSAMY V, OHTA M, KANRAR S, et al. ICE1: A regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. Genes Dev, 2003, 17(8): 1043-1054.
- [5] VOGEL J T, ZARKA D G, VAN BUSKIRK H A, et al. Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis* [J]. Plant J, 2005, 41(2): 195-211.
- [6] FOWLER S, THOMASHOW M F. *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway[J]. Plant Cell, 2002, 14(8): 1675-1690.
- [7] KREPS J A, WU Yajun, CHANG Hursong, et al. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress[J]. Plant Physiol, 2002, 130(4): 2129-2141.
- [8] SEKI M, NARUSAKA M, ISHIDA J, et al. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray[J]. Plant J, 2002, 31(3): 279-292.
- [9] JUNG Sunhee, LEE Jiyeon, LEE D H. Use of SAGE technology to reveal changes in gene expression in *Arabidopsis* leaves undergoing cold stress[J]. Plant Mol Biol, 2003, 52(3): 553-567.
- [10] WANG J, COOMBES K R, HIGHSMITH W E, et al. Differences in gene expression between B-cell chronic lymphocytic leukemia and normal B cells: A meta-analysis of three microarray studies [J]. Bioinformatics, 2004, 20(17): 3166-3178.
- [11] EGGER M, SMITH G D. Meta-analysis: Potentials and promise[J]. B M J, 1997, 315(7119): 1371-1374.
- [12] RHODES D R, BARRETTE T R, RUBIN M A, et al. Meta-analysis of microarrays: Interstudy validation of gene expression profiles reveals pathway dysregulation in prostate cancer[J]. Cancer Res, 2002, 62(15): 4427-4433.

- [13] CHOI J K, YU U, KIM S, et al. Combining multiple microarray studies and modeling inter-study variation [J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(Suppl. 1): 84-90.
- [14] PARKT, YI S G, SHIN Y K, et al. Combining multiple microarrays in the presence of controlling variables [J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(14): 1682-1689.
- [15] LI Cheng, WONG Winghung. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: Expression index computation and outlier detection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(1): 31-36.
- [16] TUSHER V G, TIBSHIRANI R, CHU G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(19): 5116-5121.
- [17] ZHOU Xin, SU Zhen. EasyGO: Gene ontology-based annotation and functional enrichment analysis tool for agricultural species [J]. *BMC Genomics*, 2007, 8: 246.
- [18] O'CONNOR T R, DYRESON C, WYRICK J J. Athena: A resource for rapid visualization and systematic analysis of *Arabidopsis* promoter sequences [J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(24): 4411-4413.
- [19] ASHBURNER M, BAU C A, BLAKE J A, et al. Gene ontology: Tool for the unification of biology [J]. *Nat Genet*, 2000, 25(1): 25-29.
- [20] FUJITA M, FUJITA Y, NOUTOSHI Y, et al. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: A current view from the points of convergence in the stress signaling networks [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2006, 9(4): 436-442.
- [21] KREPS J A, WU Yajun, CHANG Hursong, et al. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic and cold stress [J]. *Plant Physiol*, 2002, 130(4): 2129-2141.
- [22] ICHIMURA K, MIZOGUCHI T, YOSHIDA R, et al. Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6 [J]. *Plant J*, 2000, 24(5): 655-665.
- [23] TEIGE M, SCHEIK E, EULGEM T, et al. The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis* [J]. *Mol Cell*, 2004, 15(1): 141-152.
- [24] CHEN Q, XIAO S, CHYE M E E. Overexpression of the *Arabidopsis* 10-Kilodalton acyl-coenzyme A-binding protein ACBP6 enhances freezing tolerance [J]. *Plant Physiol*, 2008, 148(1): 304-315.
- [25] CHU Boyang, SNUSTAD D P, CARTER J V. Alteration of β -tubulin gene expression during low-temperature exposure in leaves of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiol*, 1993, 103(2): 371-377.
- [26] KIM M H, SONODA Y, SASAKI K, et al. Interactome analysis reveals versatile functions of *Arabidopsis* COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN 3 in RNA processing within the nucleus and cytoplasm [J]. *Cell Stress Chaperons*, 2013, 18(4): 517-525.
- [27] NUTRICATI E, MICELI A, BLANDO F, et al. Characterization of two *Arabidopsis thaliana* glutathione S-transferases [J]. *Plant Cell Rep*, 2006, 25(9): 997-1005.
- [28] SAPPL P G, CARROLL A J, CLIFTON R, et al. The *Arabidopsis* glutathione transferase gene family displays complex stress regulation and co-silencing multiple genes results in altered metabolic sensitivity to oxidative stress [J]. *Plant J*, 2009, 58(1): 53-68.
- [29] JAIN M, GHANASHYAM C, BHATTACHARJEE A. Comprehensive expression analysis suggests overlapping and specific roles of rice glutathione S-transferase genes during development and stress responses [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 73.
- [30] PENFIELD S, JOSSE E, KANNANGARA R, et al. Cold and light control seed germination through the bHLH transcription factor SPATULA [J]. *Curr Biol*, 2005, 15(22): 1998-2006.
- [31] SIDAWAY-LEE K, JOSSE E M, BROWN A, et al. SPATULA links daytime temperature and plant growth rate [J]. *Curr Biol*, 2010, 20(16): 1493-1497.
- [32] SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Molecular responses to dehydration and low temperature: Differences and cross-talk between two stress signaling pathways [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2000, 3(3): 217-223.
- [33] SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SEKI M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2003, 6(5): 410-417.
- [34] RAFFELSBERGER W, DEMBÉLÉ D, NEUBAUER M G, et al. Quality indicators increase the reliability of microarray data [J]. *Genomics*, 2002, 80(4): 385-394.
- [35] GRAY G R, CHAUVIN L P, SARHAN F, et al. Cold acclimation and freezing tolerance: A complex interaction of light and temperature [J]. *Plant Physiol*, 1997, 114(2): 467-474.
- [36] WANNER L A, JUNTILA O. Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 1999, 120(2): 391-399.
- [37] KIM H J, KIM Y K, PARK J Y, et al. Light signalling mediated by phytochrome plays an important role in cold-induced gene expression through the C-repeat/dehydration responsive element (C/DRE) in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2002, 29(6): 693-704.
- [38] NIMGAONKAR A, SANOUDOU D, BUTTE A J, et al. Reproducibility of gene expression across generations of Affymetrix microarrays [J]. *BMC Bioinformatics*, 2003, 4: 27.